

藤田 日奈¹⁾、与茂田 敏¹⁾、泉 久尚²⁾、福永 浩司²⁾

1) クラシエ製薬株式会社 漢方研究所 2) 東北大学大学院薬学研究所・薬理学分野



はじめに

脳は安静時でも血中グルコースの20%以上を消費する。神経細胞内ではATP消費の半分以上は活動電位の伝播から神経伝達物質の放出に至る前シナプス領域の活動に使われる¹⁾。このような神経活動だけでなく、現在では『記憶分子』と考えられているカルモデュリン依存性キナーゼII (CaMK II)の活性にもATPが必須であり、ATP存在下では自己リン酸化が進み恒常的に活性を持つようになる。また、CaMK IIは海馬に多く存在するが、海馬の神経新生にはATPから合成されるセカンドメッセンジャーのcAMPにより活性化されるCREB (cAMP response element binding protein)のリン酸化を介し、BDNFなどCREB下流の遺伝子発現が調整されている²⁾。

アルツハイマー病やパーキンソン病のような神経変性疾患では、障害部位の細胞機能低下や細胞死が観察されており、その背景には神経細胞での低栄養や低酸素によるATPの減少・枯渇が関与していると考えられている³⁾。また、神経変性疾患に限らず、加齢に伴って筋力の低下や心身の脆弱性が存在する、いわゆるフレイル病態の概念としてATP産生系の低下による分子恒常性維持機構の変化が指摘されている⁴⁾。したがって、ATPの減少を防ぐことでこれら疾患の発症の予防と進行の抑制が可能と考えている。

細胞が正常な機能を発揮するには十分な量のATPが存在することが重要である。ATPの減少を抑制する薬剤は神経保護作用があり、いろいろな疾患での機能低下の防止に有効性が期待できる。

われわれのこれまでの検討では、近赤外分光法により非侵襲・連続的に脳酸素代謝や脳血液循環の変化を評価できるNIRO-200NXを用いて課題遂行時の前頭葉ヘモグロビンをモニタリングしたところ、抑肝散加陳皮半夏投与群は対照群と比較して左脳の酸素化ヘモグロビン変化量が有意に増加することを確認しており⁵⁾、本剤が特に暴言や不穏などの攻撃性を中心としたBPSDに有効であったこと⁶⁾と密接に関連すると考えている。

また、抑肝散加陳皮半夏の投与により課題遂行時に脳酸素代謝を高く維持できたことは、同量の課題を遂行する上で、脳賦活時においてATP量を維持していることによると推測された⁵⁾。

そこで今回、アルツハイマー病モデルとして知られる嗅球摘出モデルのマウス海馬における抑肝散加陳皮半夏の構成生薬である白朮の海馬でのATP量に対する影響を評価した。

また、神経細胞死で細胞外にカリウムが流出することによりエネルギー代謝の亢進が起こると考えられるが、脳組織を高カリウム処理や電氣的に刺激すると、エネルギー消費の亢進とそれに伴うエネルギー産生の賦活が起こるため、組織の酸素消費亢進に伴い需要性低酸素が起こることが報告されている⁷⁾。低酸素はミトコンドリアの酸化的リン酸化による

ATPの生成を抑制するため、脳の機能維持には円滑なATPの生成が要求されるが、これが阻害された場合、認知機能の低下をはじめとした種々の脳機能の低下が生じると考えられる。

そこで、白朮由来成分のアトラクチレノリドⅢについて、高カリウム処理による細胞死に対する細胞保護作用と細胞内ATP量への影響を検討した。

試験方法と結果

● 試験1

アルツハイマー病の患者の脳では、海馬での顕著な神経細胞死と萎縮が認められることが知られており、アルツハイマー病のモデルマウスである嗅球摘出(OBX)モデルマウス脳でも海馬の萎縮が起こることが報告されている。嗅球摘出により、海馬でCaMK II発現量の低下とCREBリン酸化の顕著な阻害が起こるが、これは海馬でのATP量の低下により生じる結果であると推測される。

そこで、OBXモデルを用いて、マウスの海馬におけるATP量を測定し、さらに白朮エキスの投与による海馬ATP量への影響について評価した。

【方法】 8週齢DDYマウスを用いて、嗅球摘出モデルは既報⁸⁾と同様に作製した。

なお、本実験は東北大学の動物実験倫理委員会により承認された。白朮エキスは219mg/kgにて2週間経口投与し、脳の家馬全体におけるATP量(ATPアッセイキット、東洋インキ社製)を測定した。

【結果】 図1に示したように、嗅球摘出によりマウス海馬中のATP量は有意に減少したが($p < 0.001$)、白朮エキスの投与によりATP量減少が有意に抑制された($p < 0.001$)。これらの結果から、嗅球摘出により海馬で生じる神経変性に対して白朮は海馬中のATP量を増加させることで細胞保護効果を有すること

図1 嗅球摘出(OBX)モデルを用いたマウス海馬中のATP量に対する影響

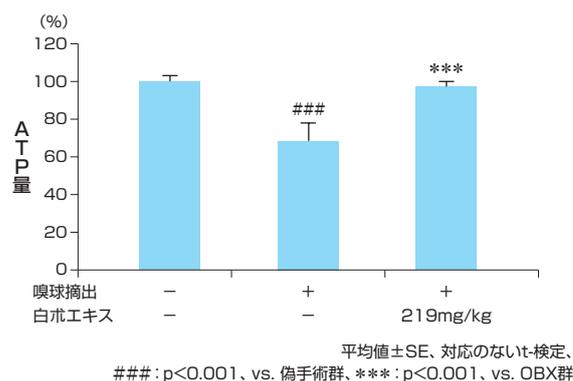


図2 PC12細胞におけるカリウム処理による細胞内ATP量及び細胞生存率に対する影響

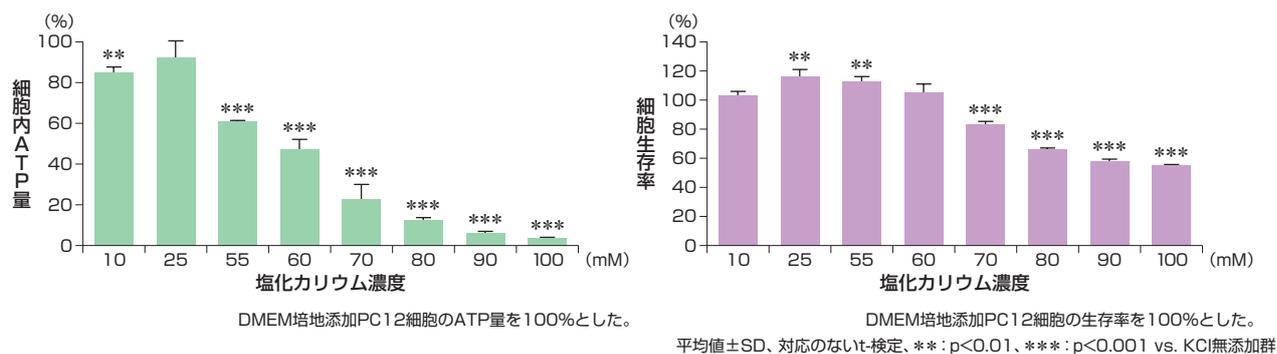
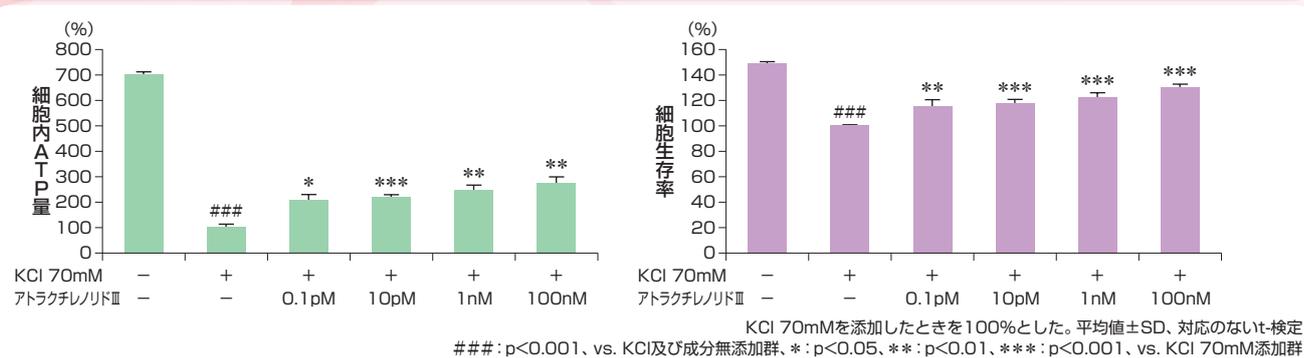


図3 PC12細胞における高カリウム(70mM)処理による細胞内ATP量及び細胞生存率に対する影響



が推測された。また、白朮由来のアトラクチレノリドⅢの投与によっても同様の効果が得られることを別の実験で確認している。

● 試験2

PC12細胞(ラット副腎髄質由来褐色細胞腫)を用いて、カリウム濃度と細胞内ATP量及び細胞生存率との関係を明らかにすべく、カリウム濃度を段階的に増加させて細胞内ATP量と細胞生存率の変化を調べた。

【方法】 PC12細胞を用いて、KClを0~100mMで段階的に増加させ24時間後に細胞内ATP量(Cell Titer Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega社製)と細胞生存率(CCK8, 同仁化学社製)を測定した。

【結果】 図2に示したように、細胞内ATP量はカリウムを55mM以上の濃度で処理した場合、60%以下と有意に低下した。細胞生存率については、カリウムを70mM以上の高濃度で処理した場合は細胞生存率が有意に低下したが、一方で、カリウムを25mM、あるいは55mMで処理したときはカリウムで処理しなかった場合と比較して細胞生存率が有意に増加し細胞の賦活化が観察された。

これらの結果から、カリウム55mMの濃度で処理した場合、酸素消費の亢進がATP産生の低下を引き起こし、神経細胞に影響を及ぼしたと考えられる。

● 試験3

白朮由来成分のアトラクチレノリドⅢについて、高カリウム処理による細胞死に対する細胞保護作用と細胞内ATP量への影響を検討する目的で、PC12細胞を用いて高カリウム条件下(70mM)での細胞内ATP量と細胞生存率を評価した。

【方法】 PC12細胞を用いて、KCl 70mMとアトラクチレノリドⅢを添加して24時間後に細胞内ATP量(Cell Titer Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega社製)と細胞生存率(CCK8, 同仁化学社製)を測定した。

【結果】 図3に示したように、細胞内ATP量は、高カリウム処理により有意に低下したが、アトラクチレノリドⅢ添加によりATP量の低下を抑制し、0.1pMという低濃度においてもATP量の低下を抑制した(図3左)。

また、細胞生存率については、高カリウム処理により有意に低下し、アトラクチレノリドⅢ添加により、0.1pM以上の濃度で有意に生存率低下を抑制した(図3右)。

これらの結果から、アトラクチレノリドⅢが高カリウム条件下でATP量の低下抑制作用を示したことは、ATP産生を維持し細胞死を抑制した可能性が示唆された。

● 試験4

アトラクチレノリドⅢの高カリウムの条件下で細胞内ATP量の低下抑制のメカニズムを検証するため、CE-TOFMS system(HMT社)により一次代謝物を評価した。

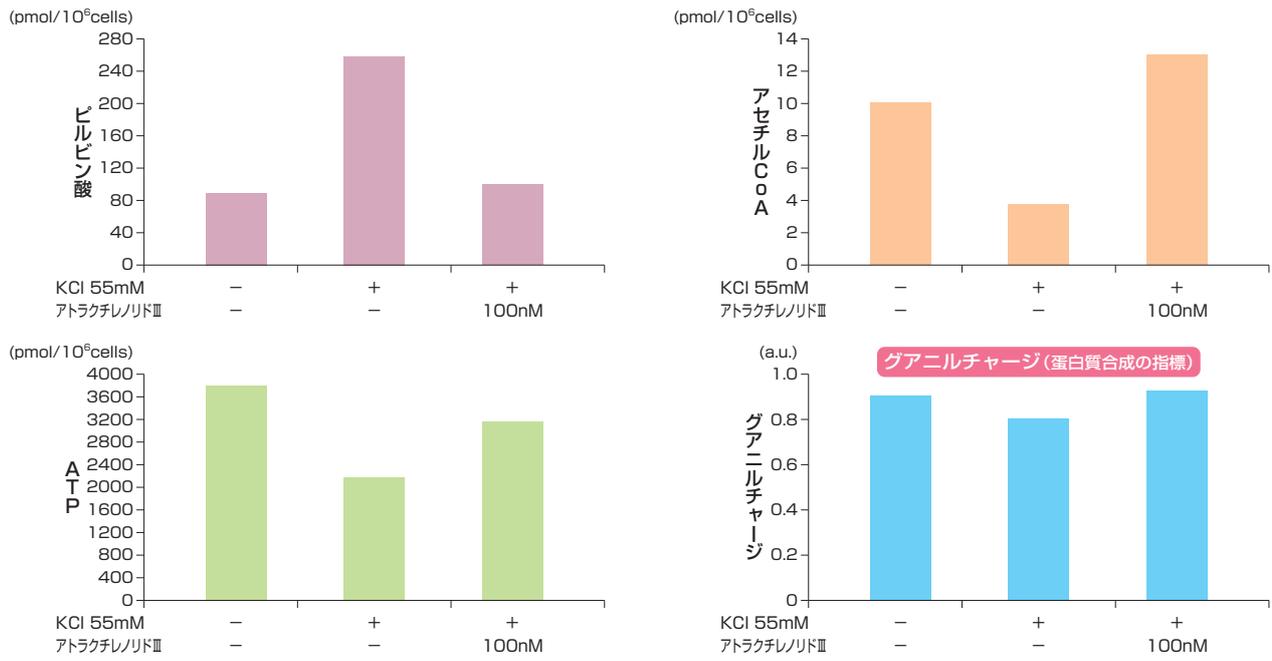
【方法】 試験2と同様。この際、必要な細胞数を確保するため細胞生存率の低下が認められず細胞内ATP量が顕著に減少する条件であるKCl 55mMの濃度にて検討した。

【結果】 図4で示したように、カリウム処理によりPC12細胞内のピルビン酸の増加、アセチルCoAとATPの減少が確認され、ミトコンドリアでのATP産生低下が示唆された。また、グアニルチャージがカリウム処理により0.9から0.8に低下した。このグアニルチャージはタンパク質合成に関わる必須エネルギー源であるGTPを用いた指標で、0.8以上で細胞が成長・活性化していると考えられている^{9,10)}。

アトラクチレノリドⅢの添加により、カリウム処理による変化が抑制され、コントロールに近い挙動を示した。

これらの結果から、カリウム処理ではミトコンドリア内でアセチルCoAから生成されるATP量が減少することが明らかとなった。また、カリウム処理により低下したグアニルチャージはアトラクチレノリドⅢの添加により低下が抑制さ

図4 PC12細胞にカリウム (55mM) 処理をしたときのメタボローム解析結果とアトラクチレノリドⅢ添加による影響

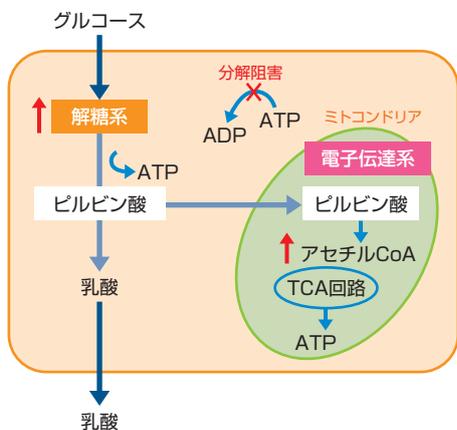


引用: 日本薬学会 第133年会, 小林ほか.

れコントロール群と同程度であった。これらの結果から細胞機能が維持されていると考えられることから、アトラクチレノリドⅢの添加による細胞内ATP量の増加は、ATP分解の抑制ではなくエネルギー代謝が維持されたことによるもので、その結果、細胞保護効果を示したものと推察された。

ミトコンドリア内でアセチルCoAから産生されるATP生成が低下していること、一方で、アトラクチレノリドⅢ添加により細胞内でのタンパク合成がコントロール群と同程度に維持されており、ATP生成が維持された結果と考えられた。

図5 白朮の作用 (推定)



今回のカリウム条件下での細胞は、エネルギー代謝亢進による必要性低酸素の状態でありタンパク質合成を制限せざるを得ない状態と考えられるが、アトラクチレノリドⅢの添加によりエネルギー枯渇を回避させて細胞保護に働いたと考えられる。このことは、カリウム条件下でアトラクチレノリドⅢが共存するとピルビン酸からアセチルCoAが生成されていることから、糖の取り込みにより解糖系が亢進しているか、細胞内のATP分解酵素を阻害したのか、あるいは効率的に酸素を消費することによりミトコンドリアでのATP生成が亢進したことなどが考えられ、今後の検討課題である(図5)。

また、アトラクチレノリドⅢの高カリウム処理による細胞死に対する抑制作用は、細胞内ATP量を保つことで細胞膜電位が維持されたことにより神経保護効果が認められたと考えられる。

【参考文献】

- 1) Atwell D, et al: An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *JCBFM* 21: 1133-1145, 2001
- 2) Shioda N, et al: Neurochemical mechanisms of a novel Alzheimer's disease therapeutics on improvement of cognition and depressive behavior. *Yakugaku Zasshi* 131: 505-511, 2011
- 3) 垣塚 彰: ATP恒常性の破綻と疾患. *医学のあゆみ* 254: 361-367, 2015
- 4) 佐竹昭介: 高齢者医療におけるサルコペニア・フレイルの位置づけ. *医業ジャーナル* 51: 2095-2100, 2015
- 5) 藤田日奈 ほか: ランダム化比較オープン試験による抑肝散加陳皮半夏の認知機能に関する臨床的検討. *精神科* 23: 130-138, 2013
- 6) 岡原一徳 ほか: 認知症患者の行動・心理状態(BPSD)に対する抑肝散加陳皮半夏長期投与の安全性および有効性の検討. *Dementia Japan* 26: 196-205, 2012
- 7) 佐々木 徹: 活性酸素の生理機能—エネルギー代謝亢進の解除時における活性酸素の生成亢進— *基礎老化研究* 35: 17-26, 2011
- 8) Han F, et al: The vanadium (IV) compound rescues septo-hippocampal cholinergic neurons from neurodegeneration in olfactory bulbectomized mice. *Neuroscience* 151: 671-679, 2008
- 9) Sharon R. Ford, et al: Adenylate and guanylate energy charges in a subsurface pseudomonas sp. *Proc. Okla. Acad. Sci.* 74: 31-36, 1994
- 10) Wiebe W.J., et al: Use of the adenylate energy charge ratio to measure growth state of natural microbial communities. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 2112-2115, 1975
- 11) Chen YJ, et al: Neuroprotective effects of icaritin on brain metabolism, mitochondrial functions, and cognition in triple-transgenic alzheimer's disease mice. *CNS Neurosci Ther* 22: 63-73, 2016

考察とまとめ

アルツハイマー病モデルマウスの脳内ATP量が低下することが報告されている¹¹⁾。今回、OBXモデルマウスにおいても、海馬におけるATP量が偽手術群と比較して有意に減少したが、白朮エキスの投与によりATP量の減少が有意に抑制された。

海馬におけるATPの低下抑制は、ATPの消費量の低下、あるいはATP産生量の増加に起因すると考えられた。このことについて検証するために一連の細胞試験を実施した結果、細胞外高カリウム条件下での細胞内ATP量減少に対して白朮の有効成分であるアトラクチレノリドⅢは抑制作用を示した。さらに、メタボローム解析の結果から、カリウム処理では、